

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/029253 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/57,
9/50, A61K 38/48

[DE/DE]; Bürgermeister-Smidt-Strasse 178, 27568
Bremerhaven (DE). VALENTIN, Klaus [DE/DE]; Hafen-
strasse 62, 27576 Bremerhaven (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003180

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. September 2003 (21.09.2003)

(81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 44 842.6 22. September 2002 (22.09.2002) DE

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): STIFTUNG ALFRED-WEGENER-INSTI-
TUT FÜR POLAR- UND MEERESFORSCHUNG
[DE/DE]; Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 16. Dezember 2004

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MOCK, Thomas

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCES CODING FOR PROTEOLYTIC ENZYMES IN THE FORM OF SPECIFIC PRO-
TEASES, CORRESPONDING POLYPEPTIDES AND USE OF THE SAME

(54) Bezeichnung: FÜR PROTEINSPALTENDE ENZYME IN FORM VON SPEZIFISCHEN PROTEASEN KODIERENDE NU-
KLEINSÄURESEQUENZEN, ZUGEHÖRIGE POLYPEPTIDE UND VERWENDUNG VON ALLEN

(57) Abstract: The invention relates to enzymes from the specific groups of calpain proteases, which take part in a plurality of metabolic processes, e.g. by acting on the apoptosis, for certain cancerous diseases and during cell migration. The invention also relates to enzymes from the group of metalloproteases which develop, e.g. activities during fertilisation, and take part in blood pressure regulation as ACEs and as collagenases in collagen metabolism. A potential need of such enzymes is mainly covered today by plant and animal sources. Known organisms in which such proteases naturally occur exclusively come from warmer regions, such that a costly heat supply necessitating complex apparatus is required during the production thereof. Organisms comprising enzymes adapted to the cold are known however. The invention thus also relates to nucleic acid sequences coding for a calpain 7 protease and a zinc metalloprotease, which originate from the marine diatoms *Fragilariopsis cylindrus* adapted to the cold and correspond to SEQ ID No.1, SEQ ID No.2 or functional variants or fragments having at least 8 nucleotides thereof.

(57) Zusammenfassung: Enzyme aus der spezifischen Gruppe der Calpain-Proteasen sind an vielen Stoffwechselvorgängen beteiligt, z.B. durch Einflussnahme auf die Apoptose, bei bestimmten Krebserkrankungen und bei der Zell-Migration. Enzyme aus der Gruppe der Metalloproteasen entwickeln z.B. Aktivitäten bei der Befruchtung, sind als ACE bei der Blutdruckregulierung und als Collagenasen beim Collagen Stoffwechsel beteiligt. Ein etwaiger Bedarf an solchen Enzymen muss heute hauptsächlich aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden. Bekannte Organismen, in denen solche Proteasen natürlicherweise vorkommen, stammen ausschließlich aus wärmeren Regionen, sodass bei ihrer Produktion eine ökonomisch und apparatetechnisch aufwändige Wärmezufuhr erforderlich ist. Bekannt sind jedoch auch Organismen, die kälteangepasste Enzyme aufweisen. Die Erfindung beansprucht daher für eine Calpain-7-Protease und eine Zink-Metalloprotease kodierende Nukleinsäuresequenzen, die aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariopsis cylindrus* stammen und gemäß SEQ ID No.1, SEQ ID No.2 oder als funktionelle Varianten oder als Abschnitte mit mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet sind.

WO 2004/029253 A3

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03180A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/57 C12N9/50 A61K38/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 18 September 2002 (2002-09-18), XP002287494 Database accession no. AY074514 abstract	1-5
X	----- WO 02/02775 A (BASF AG ; DEAR NEIL T (DE); BOEHM THOMAS (DE)) 10 January 2002 (2002-01-10) cited in the application abstract; claims 1-12 ----- -/-	1-6,8

RB ①

RB ②

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 July 2004

Date of mailing of the international search report

27 SEP 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/03180

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HUANG YUANHUI ET AL: "The calpain family and human disease" August 2001 (2001-08), TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, VOL. 7, NR. 8, PAGE(S) 355-362, XP002287493 ISSN: 1471-4914 cited in the application the whole document</p>	1-5
X	<p>PERRIN B J ET AL: "Calpain" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 34, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 722-725, XP002287492 ISSN: 1357-2725 the whole document</p>	1-5
A	<p>ESKE, KRISTIN: "Zahllose Geheimnisse der Natur warten noch unter Wasser" BIOLOG, no. 3, 2000, pages 1-7, XP002263051 GREIFSWALD, ROSTOCK cited in the application the whole document</p>	
A	<p>"Leben unter extremen Bedingungen"[Online] 31 January 2002 (2002-01-31), XP002287495 Retrieved from the Internet: URL: http://www.innovations-report.de/html/berichte/geowissenschaften/bericht-7421.html the whole document</p>	
A	<p>DATABASE EMBL [Online] 15 January 2001 (2001-01-15), XP002287496 Database accession no. AB028639 abstract</p>	
X,P	<p>DATABASE EMBL [Online] 22 July 2003 (2003-07-22), XP002287500 Database accession no. CF076121 abstract</p>	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

/DE 03/03180

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 6 and 8 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-9 All in part

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1-9 (all in part)

Nucleic acid SEQ ID NO:1 coding for the protease calpain from *Fragliarius cylindrus*, the encoded polypeptide, method for the production thereof and the use thereof in cleaning and therapy.

2. Claims: 1-9 (all in part)

See 1st invention, SEQ ID NO:2 coding for zinc metalloprotease.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP03/03180

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0202775	A	10-01-2002	DE	10031932 A1	10-01-2002
			AU	7060301 A	14-01-2002
			CA	2414592 A1	10-01-2002
			WO	0202775 A2	10-01-2002
			EP	1294895 A2	26-03-2003
			JP	2004503221 T	05-02-2004
			US	2004072174 A1	15-04-2004

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NOT A WAREHOUSE COPY

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/03/03180

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/57 A61K38/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EP0-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL [Online] 18. September 2002 (2002-09-18), XP002287494 Database accession no. AY074514 Zusammenfassung	1-5
X	----- WO 02/02775 A (BASF AG ; DEAR NEIL T (DE); BOEHM THOMAS (DE)) 10. Januar 2002 (2002-01-10) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Ansprüche 1-12 ----- -/-	1-6,8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist.

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Juli 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27 SEP 2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGEBENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HUANG YUANHUI ET AL: "The calpain family and human disease" August 2001 (2001-08), TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, VOL. 7, NR. 8, PAGE(S) 355-362, XP002287493 ISSN: 1471-4914 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-5
X	PERRIN B J ET AL: "Calpain" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, Bd. 34, Nr. 7, Juli 2002 (2002-07), Seiten 722-725, XP002287492 ISSN: 1357-2725 das ganze Dokument	1-5
A	ESKE, KRISTIN: "Zahllose Geheimnisse der Natur warten noch unter Wasser" BIOLOG, Nr. 3, 2000, Seiten 1-7, XP002263051 GREIFSWALD, ROSTOCK in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
A	"Leben unter extremen Bedingungen"[Online] 31. Januar 2002 (2002-01-31), XP002287495 Gefunden im Internet: URL:http://www.innovations-report.de/html/berichte/geowissenschaften/bericht-7421.html> das ganze Dokument	
A	DATABASE EMBL [Online] 15. Januar 2001 (2001-01-15), XP002287496 Database accession no. AB028639 Zusammenfassung	
X,P	DATABASE EMBL [Online] 22. Juli 2003 (2003-07-22), XP002287500 Database accession no. CF076121 Zusammenfassung	1-5

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl die Ansprüche 6 und 8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-9 alle teilweise

all in part

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-9 (alle teilweise)

Nukleinsäure SEQ ID No.1 kodierend für die Protease Calpain aus *Fragilarius cylindrus*, das kodierte Polypeptid, Verfahren zu seiner Herstellung sowie deren Verwendungen zu Reinigungs- und Therapiezwecken.

2. Ansprüche: 1-9 (alle teilweise)

siehe 1. Erfindung, SEQ ID No.2 kodierend für Zink-Metalloprotease

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 6 und 8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EE 03/03180

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0202775 A	10-01-2002	DE 10031932 A1	10-01-2002
		AU 7060301 A	14-01-2002
		CA 2414592 A1	10-01-2002
		WO 0202775 A2	10-01-2002
		EP 1294895 A2	26-03-2003
		JP 2004503221 T	05-02-2004
		US 2004072174 A1	15-04-2004